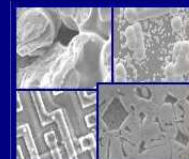




PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia
Faculdade de Física
Faculdade de Química



PGETEMA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS POR DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR E POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Marcos Aurélio Almeida Pereira
Licenciado em Química

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cassel

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Março, 2010**

“... Eu espero que os cientistas ao longo do mundo abracem a ciência dos materiais mais completamente, como um recurso para criar tecnologias, que podem, profundamente, aliviar sofrimentos e prolongar a vida.”

Robert Langer

Instituto de Tecnologia de Massachusetts

DEDICATÓRIA

Aos que colocam as sementes na terra, plantam, cultivam, cuidam e permitem que esses tesouros da natureza estejam ao nosso alcance.

Aos que buscam nesses tesouros o uso correto e adequado para aliviar dores, curar feridas, doenças, embelezar e aromatizar a alma e o corpo.

A minha mui querida e amada esposa.

AGRADECIMENTOS

Aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da PUCRS, na pessoa da então diretora professora Flavia Valladão Thiesen pelo seu empenho para o desenvolvimento das atividades práticas e desenrolar das questões burocráticas e na pessoa da professora Denise Milão por sua orientação e apoio.

A Manuel Alves Falcão, companheiro dos trabalhos de laboratório.

A Aline Machado Lucas, pela dedicação nas análises dos óleos e das frações.

À professora Ana Bertucci da Universidade do Uruguai (UDELAR) que ministrou o curso de Bioautografia, abrindo caminho para vários trabalhos de iniciação científica e pesquisas.

Ao professor Eduardo Cassel, pela iniciativa pioneira em realizar o curso de Especialização em Óleos Essenciais e pela oportunidade de trabalhar com ele e sua equipe.

À empresa Tekton Óleos Essenciais, pelo fornecimento das plantas e óleos para os testes.

Aos colegas de mestrado que foram importantes para a conclusão desta etapa.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
SUMÁRIO	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE QUADROS	9
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	10
RESUMO	11
<i>ABSTRACT</i>	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. Óleos Essenciais	17
3.2. Extração de óleos essenciais	19
3.2.1. <i>Enfleurage</i>	19
3.2.2. Destilação por Arraste a vapor	20
3.2.3. Extração com solventes orgânicos.....	20
3.2.4. Prensagem (ou expressão) a frio	20
3.2.5. Extração por CO ₂ supercrítico.....	20
3.3. Atividade Antimicrobiana	21
3.4. Métodos de Avaliação da Atividade Antimicrobiana	22
3.4.1. Método de Difusão em ágar por Bioautografia	22

3.4.2. Método de Difusão em ágar por poço, disco e cilindro.....	23
3.4.3. Fatores que influenciam na determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar	24
4. METODOLOGIA	27
4.1. Materiais e Métodos	27
4.1.1. Óleo Essencial	27
4.1.2. Microorganismos	29
4.1.3. Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana	30
4.1.4. Avaliação dos emulsionantes dos Óleos Essenciais	31
4.1.5. Preparação do inóculo	31
4.1.6. Ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	32
4.1.7. Técnica de difusão em ágar: Variante bioautografia indireta.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Resultados preliminares	35
5.2. Resultados comparativos preliminares da atividade antimicrobiana de óleos extraídos por arraste a vapor e extração supercrítica	36
5.3. Resultados da atividade antimicrobiana de óleos extraídos por arraste a vapor	39
5.3.1. Óleo Essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	39
5.3.2. Óleo Essencial de <i>Cymbopogum citratus</i> DC. Stapf.....	40
5.3.2.1. Resultado da bioautografia e da análise cromatográfica	40
5.3.2.2. Resultado da concentração inibitória mínima.....	43
5.3.3. Óleo Essencial de <i>Cymbopogum winterianus</i> Jowitt	46
5.3.3.1. Resultado da bioautografia e da análise cromatográfica.....	46
5.3.3.2. Resultado da concentração inibitória mínima.....	49
6. CONCLUSÕES	52
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1.: Tricomas Glandulares.	17
Figura 3.2.: Tricomas Glandulares.	17
Figura 3.3.: Tricomas Glandulares. (Svoboda,2000)	17
Figura 3.4.: Glândula Secretora. (Svoboda,2000)	17
Figura 3.5.. Etapas gerais do método bioautográfico.....	23
Figura 3.6.: Difusão em ágar variante cilindro.	24
Figura 3.7.: Difusão radial.	26
Figura 3.8.: Difusão radial.	26
Figura 3.9.: Difusão radial.	26
Figura 4.1.: Diagrama da Extração por Arraste a Vapor.....	28
Figura 4.2.: Diagrama da Extração Supercrítica.....	28
Figura 4.3.: Unidade piloto de extração supercrítica.....	28
Figura 4.4.: Aplicação do revelador.	30
Figura 4.5.: Bioautografia indireta.	33
Figura 4.6.: Medidas das distâncias para calcular o IR.....	34
Figura 5.1.: E. coli: 10 µL de 1×10^4 UFC/mL.....	36
Figura 5.2.: E. coli: 10 µL de 1×10^8 UFC/mL	36
Figura 5.3.: Citronela supercrítico (a) e arraste a vapor (b).	37
Figura 5.4.: Alecrim supercrítico (a) e arraste a vapor (b).	37
Figura 5.5.: CCD do óleo de capim limão com a atividade do óleo e da fração	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1.: Escala de Mac Farland.	32
Tabela 5.1.: Concentrações dos componentes majoritários dos OE supercrítico e arraste a vapor.	37
Tabela 5.2.: Resultados da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de citronela e alecrim extraídos com CO ₂ supercrítico e por arraste a vapor	38
Tabela 5.3.: Resultados da bioautografia do óleo de alecrim.....	41
Tabela 5.4.: Resultados da bioautografia do óleo de capim limão	41
Tabela 5.5.: Análise por CG/MS do óleo de Capim Limão.....	42
Tabela 5.6.: Fração F1 Capim Limão (IR 0,52 a 0,60).....	42
Tabela 5.7.: Fração F2 Capim Limão (IR 0,61 a 0,75)	42
Tabela 5.8.: Concentração inibitória mínima do capim limão.	45
Tabela 5.9.: Resultados da bioautografia do óleo de citronela.	47
Tabela 5.10.: Análise por CG/MS do óleo de citronela.	48
Tabela 5.11.: Fração F1 Citronela (IR: 0,23-0,27).....	49
Tabela 5.12.: Fração F2 Citronela (IR: 0,34-0,41).....	49
Tabela 5.13.: Concentração inibitória mínima para óleo essencial de citronela.....	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1.: Características físicoquímicas dos óleos essenciais.....	19
Quadro 4.1.: Portaria nº 15 da ANVISA: Microorganismo para avaliação da ação antimicrobiana.....	29
Quadro 4.2.: Microorganismos utilizados nos testes.....	29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

AV - arraste a vapor

CCD - Cromatografia em camada delgada

CG - Cromatografia gasosa

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DMSO - Dimetilsulfoxido

eV - Eletron-Volt

F - fração

GC/MS- Cromatografia gasosa acoplada a massa

IR - Índice de retenção

IRF - Índice de retenção da fração número

IK - Índice de Kovatz

INT - *Iodonitrotetrazolium violet*

ISO - *International Organization for Standardization*

LOPE - Laboratório de Operações Unitárias

MO - microorganismo(s)

NCCLS - *National committee for Clinical Laboratory Standards*

nm - Nanometros

OE - Óleo(s) Essencial(is)

pH - Potencial hidrogeniônico

PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

SC - supercrítico

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

Ø - Diâmetro

RESUMO

Pereira, Marcos Aurélio Almeida. **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica.** Porto Alegre. 2010. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Tecnologia e Materiais. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A utilização de óleos essenciais na pesquisa sobre a atividade antimicrobiana é bastante intensa e tem aumentado a cada ano. Porém, a influência do processo de extração na composição química dos óleos essenciais e o impacto da interação de seus compostos na atividade antimicrobiana têm sido menos estudados.

Os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. e *Cymbopogum winterianus* Jowitt foram extraídos por arraste a vapor e por extração supercrítica. O processo de extração influenciou diretamente na composição química dos óleos e conseqüentemente na atividade antimicrobiana. O óleo de *Cymbopogum citratus* DC. Stapf. foi extraído por arraste a vapor e durante a avaliação da atividade antimicrobiana, o composto citral apresentou uma forte atividade.

A atividade antimicrobiana dos óleos estudados foi avaliada pelo método de bioautografia indireta que permite a separação da composição química dos óleos em frações, as quais foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (GC-MS).

A concentração inibitória mínima dos óleos *Cymbopogum citratus* DC. Stapf. e *Cymbopogum winterianus* Jowitt, os quais foram ativos contra os microorganismos citados na Portaria 15 da ANVISA de 1988, foi determinada pelo método de diluição em tubos. Além disto, as diluições em tubos foram plaqueadas, por alça calibrada, a fim de se verificar seu efeito bacteriostático ou bactericida.

Os resultados indicaram que o citral, citronelol e orto-cimeno, são componentes ativos do ponto de vista antifúngico e antimicrobiano.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, Destilação por Arraste a Vapor, Extração Supercrítica, Bioautografia.

ABSTRACT

Pereira, Marcos Aurélio Almeida. **Antimicrobial Activity Study of Essential Oils Extracted by Steam Drag and Supercritical**. Porto Alegre. 2010. Project of Masters in Materials Engineering and Technology. Pos-Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The use of essential oils in antimicrobial activity research is quite intense and it has increased every year. However, the influence of the extraction process on the chemical composition of the essential oils and the impact of the interaction between its compounds in antimicrobial activity has been less studied.

The essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. and *Cymbopogon winterianus* Jowitt were extracted by steam drag and by supercritical extraction. The extraction process directly influenced the chemical composition of the oils and consequently the antimicrobial activity. The oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf. was extracted by steam drag and during the antimicrobial activity evaluation the citral compound presented strong activity.

The antimicrobial activity of the three essential oils studied was evaluated by indirect bioautography method that allows the separation of chemical composition into portions which were analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS).

The minimal inhibitory concentration of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf. and *Cymbopogon winterianus* Jowitt oils, which were active against the microorganisms mentioned on the Portaria 15 of ANVISA of 1988, was established by the dilution in tubes method. In addition, the dilutions in tubes were spread on a Petri dish, by calibrated loop, in order to verify the bacteriostatic or bactericidal effect.

The results indicated that the citral, citronelol and orto-cimeno, are active compounds from an antifungal and antibacterial point of view.

Key Words: Antimicrobial Activity, Steam Drag extraction, Supercritical extraction, Bioautography method

1. INTRODUÇÃO

O emprego de plantas como medicamentos se dá desde o início da história da humanidade. Recorrer às propriedades curativas de certas espécies foi um dos primeiros esforços na busca de soluções terapêuticas através da natureza. A evolução tecnológica permitiu desvendar a composição química de alguns vegetais e seus efeitos, confirmando, muitas vezes, a utilização popular (Franco, 2005). Seguindo esta orientação, foram desenvolvidos diferentes tipos de medicamentos para o tratamento e cura das enfermidades causadas por microorganismos, porém sua eficácia, muitas vezes, ficou comprometida pelo surgimento de novas enfermidades e o reaparecimento das já existentes com maior resistência a tratamentos anteriormente utilizados.

Entre o conjunto de produtos naturais utilizados no desenvolvimento de medicamentos, muitas investigações têm sido realizadas por pesquisadores de forma a identificar as atividades antifúngicas, antibacterianas, fungistáticas, bacteriostáticas dos óleos essenciais e suas concentrações inibitórias mínimas (CIM). O combate de microorganismos como *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* com extratos de plantas e com os óleos essenciais, tem sido alvo de estudos como afirma Bidilack *et al.* (2000).

Os óleos essenciais (OE), derivados do metabolismo secundário das plantas, têm sua origem como uma resposta química às continuadas interações do material vegetal com animais e outras plantas (Araújo, 2005) e com o objetivo de defender-se, comunicar-se e trocar informações (Bertucci, 2008). As condições climáticas regionais, tais como temperatura, luminosidade e altitude, aliadas às condições encontradas no solo, como pH, disponibilidade de nutrientes e umidade, as chamadas condições edáficas, influenciam no rendimento e na qualidade do óleo. Condições edafoclimáticas adequadas a cada espécie vegetal são importantes para promover o máximo rendimento de óleo essencial, bem como influenciam na relação percentual entre seus compostos (Lima, 2003, Curioni, 2006).

O tipo de processo de extração também influencia fortemente no rendimento e na composição dos óleos essenciais obtidos a partir de plantas aromáticas e a definição do método adequado depende de vários fatores, como a concentração de

óleo essencial, o local onde ele se encontra na planta aromática e a condição em que a planta é processada.

O método de bioautografia, que congrega os métodos de cromatografia em camada delgada e de difusão em ágar, vem sendo cada vez mais difundido, pois é um método rápido e de fácil execução, oferecendo como vantagem a possibilidade de separar os compostos de uma mistura complexa para determinar, de forma qualitativa, o potencial antimicrobiano de uma substância ou conjunto de substâncias. O método de diluição em tubos é tradicionalmente utilizado na determinação da concentração inibitória mínima.

O estudo dos óleos e de suas frações, obtidas através do fracionamento por cromatografia, a análise da composição química desses, a avaliação da atividade antimicrobiana nas frações e no óleo, o cruzamento das informações dessa atividade com a composição química, tentando identificar sinergismos, antagonismos e especificidades desses compostos, é uma forma de contribuir com a sociedade científica que busca fontes alternativas e compostos naturais promissores ao desenvolvimento de novos antibióticos (Duarte, 2006) para o combate aos microorganismos que vêm apresentando, cada vez mais, uma maior resistência a esses medicamentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho consiste no estudo da influência da composição química dos óleos essenciais extraídos por dois métodos, destilação por arraste a vapor e extração supercrítica, na atividade antimicrobiana em relação aos microorganismos *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, empregando técnicas qualitativas, bioautografia, e quantitativas, diluição em tubos.

Observar ainda a influência dos compostos químicos que constituem os óleos essenciais na atividade antimicrobiana, utilizando-se para isto de fracionamento em placas cromatográficas para se obter frações com um menor número de compostos químicos e testar a atividade antimicrobiana dos óleos e das frações, buscando identificar sinergismo, antagonismo e compostos ativos em relação aos microorganismos. A técnica empregada para verificar a atividade antimicrobiana foi a bioautografia em capa de ágar (bioautografia indireta) e a técnica de diluição em tubos utilizada para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM).

2.2 Objetivos Específicos

- Utilizar os métodos de extração dos óleos essenciais a partir de plantas aromáticas, *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, *Cymbopogon winterianus* Jowitt, pelos métodos de destilação por arraste a vapor e extração supercrítica;
- Avaliar as atividades antimicrobianas através de experimentos com os óleos essenciais, *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, *Cymbopogon winterianus* Jowitt, relacionados às atividades antimicrobianas para fungos, bactérias e leveduras;
- Utilizar a cromatografia em camada delgada para fracionar os óleos essenciais que obtiverem maior atividade antimicrobiana e identificar as frações que conservam esta atividade.

- Identificar e quantificar as composições dos óleos essenciais e das frações com atividade antimicrobiana para as diferentes amostras por CG/MS;
- Estudar os processos de difusão dos óleos essenciais em meio de cultura;
- Definir as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos óleos essenciais;
- Avaliar de forma comparativa a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos pelo processo de destilação por arraste a vapor e pelo método de extração por CO₂ supercrítico;
- Avaliar de forma comparativa a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e das suas frações que apresentaram atividade antimicrobiana através da análise da composição do óleo essencial e das frações;
- Elucidar, se possível, a substância ou as substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana ou ainda sinergismo, antagonismo ou especificidades.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais, segundo Simões *et al.* (1999), são compostos encontrados em várias plantas e possuem como características básicas o cheiro e o sabor. Estas plantas são denominadas aromáticas e apresentam uma percentagem de óleos essenciais, em relação a sua massa seca, de 0,01% a 10,00%. Segundo Samuelsson (1999), as plantas com maior concentração de óleos essenciais pertencem às famílias *Apiaceae*, *Laminaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* e *Rutaceae*.

Os óleos essenciais ocorrem em diferentes órgãos das plantas, tais como tricomas glandulares, dutos e cavidades secretoras (Figuras 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4) ou células oleosas encontradas no tecido da planta (Samuelsson, 1999).

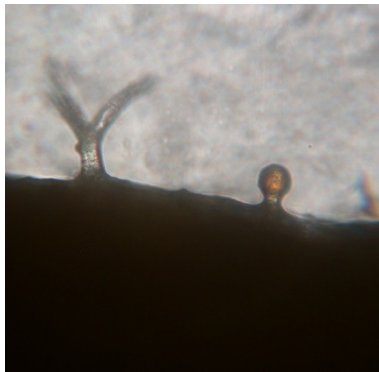


Figura 3.1.: Tricomas glandulares. (Fonte: autor)

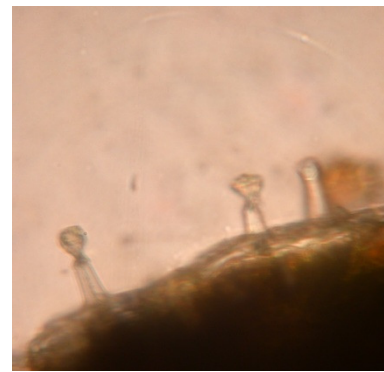


Figura 3.2.: Tricomas glandulares. (Fonte: autor)

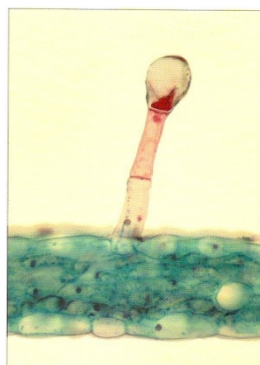


Figura 3.3.: Tricomas Glandulares (Svoboda, 2000)



Figura 3.4: Glândula secretora (Svoboda, 2000)

As estruturas onde se encontram os óleos essenciais podem estar localizadas em alguma parte específica da planta ou em toda ela. Assim, os óleos essenciais

podem ser encontrados em diversas partes, tais como: na parte aérea, como ocorre, por exemplo, na menta; nas flores, como é o caso da rosa e do jasmim; nas folhas como ocorre nos eucaliptos e no capim-limão; nos frutos como na laranja e no limão; na madeira como no sândalo e no pau-rosa; nas raízes como se observa no vetiver; e nos rizomas, como no gengibre (Melo, 2005).

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de monoterpenos e sesquiterpenos, formados pelo metabolismo secundário das plantas, freqüentemente sujeitos a fatores abióticos (Lima, 2003; Araújo, 2005). Terpenos ou isoprenos são moléculas cuja unidade básica possui um número de átomos de carbono múltiplo de cinco. Entre esses podem se citados: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}) e diterpenos (C_{20}). Estes podem ser acíclicos, mono e bicíclicos, e seus produtos oxigenados são os alcoóis, aldeídos, cetonas e compostos aromáticos (fenilpropanóides), principalmente fenóis e éteres. Também são encontrados, nos óleos essenciais, ácidos orgânicos de baixo peso molecular e cumarinas (Simões *et al.*, 1999).

O metabolismo vegetal é um conjunto de reações químicas que estão ocorrendo constantemente em cada célula. A presença de enzimas específicas garante certa direção a essas reações, o que se denomina rota metabólica. Essas reações visam primeiramente o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais das células, metabolismo primário. A produção, transformação e acumulação de outras inúmeras substâncias que não necessariamente estão relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo que as produz, muito embora garantam vantagens para sua sobrevivência e perpetuação de sua espécie em seu ecossistema, são chamadas de metabolismo secundário (Simões *et al.*, 1999).

A diversidade da composição do óleo essencial é proveniente de três rotas biossintéticas conhecidas: mevalonato, acetato e chiquimato. São provenientes da rota do ácido mevalônico ou da condensação de unidades de acetato (Simões *et al.*, 1999), por exemplo, os monoterpenos: mirceno, linalol e geraniol e os sesquiterpenos: farnesol e o nerolidol. Provenientes da rota do ácido chiquímico (Simões *et al.*, 1999) podem ser citados os fenilpropanóides: eugenol e o anetol.

Do ponto de vista físicoquímico, os óleos essenciais apresentam as seguintes características, como se observa no Quadro 3.1.

Quadro 3.1. – Características físicoquímicas dos óleos essenciais (Simões, 1999)

Óleos Essenciais
Aparência oleosa à temperatura ambiente.
Aroma agradável e intenso da maioria dos óleos.
Solúveis em solventes orgânicos apolares.
Pouca solubilidade em água, formando soluções aquosas denominadas hidrolatos.
Sabor, geralmente ácido e picante.
A maioria possui índice de refração e são opticamente ativos.

3.2. Extração dos Óleos Essenciais

Segundo Simões *et al.* (1999), a extração dos óleos pode se dar através de técnicas como destilação por arraste a vapor, hidrodestilação, extração com CO₂ supercrítico, expressão a frio, entre outros. Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo na planta (flores, folhas, cascas, raízes e rizomas) e sua utilização. Uma descrição sucinta dos processos é apresentada a seguir.

3.2.1. *Enfleurage*

Enfleurage é um método de extração empregado para extrair óleo essencial de pétalas de flores. As pétalas são depositadas, à temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante certo período de tempo. Em seguida essas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado à baixa temperatura e o produto resultante possui alto valor comercial (Lima, 2006).

3.2.2. Destilação por Arraste a Vapor

O processo consiste em passar vapor à temperatura de aproximadamente 100°C por um leito fixo de massa verde de planta aromática, interno a um vaso extrator. Pelo efeito da temperatura do vapor em fluxo ascendente, ocorre o rompimento das células odoríferas da planta aromática, em decorrência do aumento da pressão interna das células devido à vaporização parcial do óleo em seu interior. O óleo, em contato com o vapor, é arrastado para a parte superior do vaso extrator até o condensador. Isto ocorre devido à diferença de pressão entre a entrada de vapor no vaso extrator e o bocal de saída de produto do condensador. Do bocal de saída do condensador, água e óleo essencial em emulsão (o condensado) são conduzidos por gravidade ao vaso de decantação/separação, chamado de vaso Florentino, onde ocorre a separação das fases. Parte do OE que se mantém emulsionado na água forma o hidrolato (Cassel, 2008; Cassel, 2009).

3.2.3. Extração com solventes orgânicos

Os óleos essenciais são extraídos, preferencialmente, com solventes apolares que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além dos óleos essenciais. Normalmente este método é utilizado para a extração de óleos-resina e resinas presentes nas plantas aromáticas (Lima, 2006).

3.2.4. Prensagem (ou expressão) a frio

É empregado para extração de óleos essenciais de frutos cítricos. Os pericarpos desses frutos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada (Lima, 2006).

3.2.5. Extração com CO₂ supercrítico

Esse método tem a vantagem de operar a baixas temperaturas, de não usar um solvente tóxico e de permitir certa seletividade dos compostos extraídos. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura

superior ao seu ponto crítico, 31 °C e pressurizado a uma pressão acima de 73 bar, pressão crítica. Nessa condição, o CO₂ atinge o estado supercrítico no qual sua difusividade é análoga à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (Cassel *et al.*, 2008, Lima, 2006; Vargas *et al.*, 2006).

3.3. Atividade antimicrobiana

Fleming, em 1929, desenvolveu o primeiro antibiótico em escala industrial. O termo antibiótico pode ser definido amplamente como substância biossintetizada por um ser vivo com capacidade de inibir microorganismos e/ou bloquear o crescimento e replicações celulares, em concentrações relativamente pequenas (Franco, 2005). Algumas classificações são citadas por Franco (2005) para os antibióticos: de acordo com a origem química, farmacocinética e farmacodinâmica. E também de acordo com a atuação sobre o organismo invasor sem afetar o hospedeiro, chamado de específico e os inespecíficos capazes de matar ou inibir o crescimento microbiano *in vitro*, sendo considerados como anti-sépticos, germicidas, biocidas, esterilizantes e desinfetantes. Ele também classifica a atividade dos agentes antimicrobianos como bactericidas, quando matam o microorganismo durante a fase de crescimento logarítmico, onde há aumento da susceptibilidade devido ao aumento da atividade metabólica ou bacteriostático quando inibe o crescimento microbiano.

A susceptibilidade bacteriana de agentes antimicrobianos é testada *in vitro*, utilizando-se os princípios da difusão em Agar (Barry, 1985). Os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, (NCCLS, norma M2-A8, 2003, atual CLSI) para avaliar os agentes antimicrobianos convencionais. Nos testes de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, a norma proposta pelo NCCLS e também aquelas descritas nas farmacopéias, americana e brasileira não podem ser seguidas à risca, devido às propriedades de volatilidade, insolubilidade em água e composição complexa. Por isso, em testes de susceptibilidade microbiana (Nascimento, 2007), deve-se ajustar a técnica usada, o meio de cultura, os microorganismos e o solvente ao óleo essencial.

3.4. Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana

Os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana se dividem basicamente em: métodos de difusão e métodos de diluição. O método de difusão, por sua vez, se divide em difusão por disco, difusão por cilindros, difusão por poços e bioautografia direta e indireta. Os ensaios de difusão são considerados qualitativos, pois apenas mostram se existe ou não atividade antibacteriana nos produtos naturais. Os métodos de diluição em tubos ou em placas podem ser considerados semiquantitativos, quando são testadas poucas concentrações do produto natural, por exemplo, três diluições e quantitativos onde se executam diluições seriadas do produto e se determina para este, a concentração inibitória mínima (Valgas, 2002). Esses métodos e suas variantes devem ser adaptados e escolhidos conforme as facilidades operacionais que permitem ensaios relativamente rápidos e simples, com custo compatível. É importante que as adaptações sejam testadas e padronizadas para se obter reprodutibilidade e garantir assim que os resultados tenham confiabilidade.

3.4.1. Métodos de difusão em ágar por bioautografia

Os métodos bioautográficos permitem combinar a capacidade de separação da cromatografia de camada delgada (CCD) com a determinação *in situ* da atividade antimicrobiana dos componentes de uma mistura de compostos químicos. A amostra de um extrato natural é aplicada na placa de CCD e eluída com uma fase móvel adequada (Franco, 2005). Os compostos da amostra ficam adsorvidos na fase estacionária em posições relativas à sua polaridade em relação ao eluente e à sílica da placa cromatográfica. Posteriormente, o microorganismo a ser testado é inoculado sobre a placa. Na bioautografia indireta, o ágar inoculado é aplicado sobre a CCD e na bioautografia direta, o inóculo é pulverizado diretamente sobre a placa (Valgas, 2002). Após o período de incubação, verifica-se a formação de um halo de inibição no composto com atividade antimicrobiana presente na amostra (Figura 3.5). Usando-se um revelador de sais de tetrazólio, pode-se melhor visualizar as áreas de atividade antifúngica em função da desidrogenase enzimática (Hostettmann, 2003).

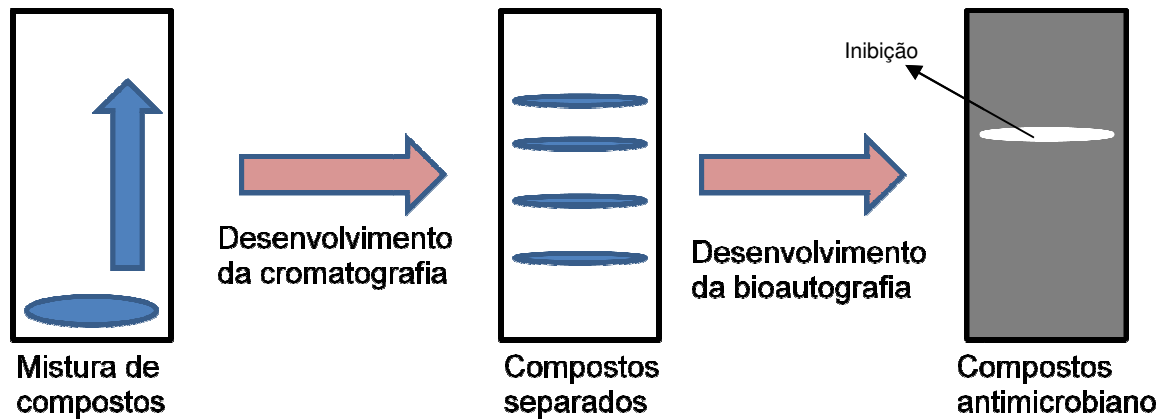


Figura 3.5.: Etapas gerais do método bioautográfico: separação dos compostos e revelação.
Adaptado de Furlan e Lopez, 2006

A bioautografia tem sido mencionada como uma metodologia eficiente para o descobrimento de novos compostos antimicrobianos e constitui uma ferramenta útil para o desenvolvimento de compostos antimicrobianos a partir de misturas complexas de extratos vegetais e óleos essenciais (Furlan e Lopez, 2006).

3.4.2. Método de difusão em ágar por poço, disco e cilindro

Este método (*The US Pharmacopeia*, 1990; Farmacopéia Brasileira, 1988) avalia a capacidade de um microrganismo de se multiplicar na presença de concentrações conhecidas de um antimicrobiano. É uma metodologia econômica e de fácil execução, demonstrando linearidade e precisão (Esmerino, 2004). As substâncias normalmente testadas por este método têm natureza hidrofílica e os testes são padronizados para esta condição (Nascimento, 2007). Diferentemente, nos ensaios com óleos essenciais, que são voláteis, insolúveis em água, viscosos e complexos, são utilizados solventes e agentes emulsificadores, a exemplo do Tween 20 (Fraternali, 2006, Kuate, 2005), Tween 80 (Tzakou, 2007), DMSO - dimetilsulfóxido (Sabulal, 2007; Rossi, 2007; Kürkçüoğlu, 2007), Dietil-eter (Oladimeji, 2004) e álcool (Tan, 2007).

O ensaio por difusão em Agar é um método físico-químico no qual o microrganismo é utilizado como “revelador”. São preparadas placas de Petry com meios de cultura inoculados com microrganismos. O óleo essencial solubilizado é aplicado sobre a superfície deste meio, em uma área restrita. A forma de aplicação é que caracteriza o tipo da variante, se cilindro (figura 3.6), disco ou ainda a construção de cavidade (poço). Após o tempo adequado de incubação, sendo o

microorganismo sensível ao produto testado, não ocorre o crescimento nas áreas onde tenha ocorrido a difusão do óleo testado, formando halos de inibição. Isso contrasta com as áreas onde não houve difusão e ocorreu o crescimento do microorganismo (Lourenço, 2006). O óleo se difunde no Agar em concentrações decrescentes e os microorganismos inoculados no meio de cultura crescem até encontrar a concentração inibitória mínima e, a partir deste ponto, se forma o halo de inibição (Esmerino, 2004).

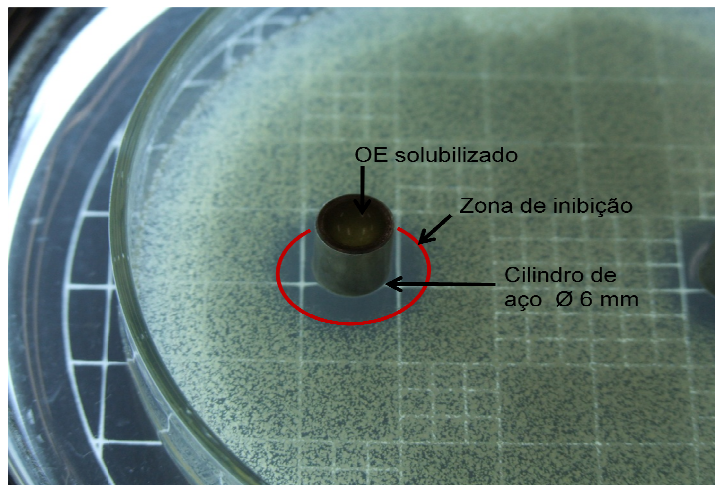


Figura 3.6.: Difusão em ágar variante cilindro. (Fonte: autor)

3.4.3. Fatores que influenciam na determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar

A robustez de um método se refere a uma medida do grau para o qual mudanças em algum parâmetro do ensaio resultarão em mudanças no valor numérico produzido. Um ensaio robusto gera um alto grau de precisão dos resultados. Sendo assim, é importante conhecermos as conseqüências das alterações dos parâmetros do teste para garantir a maior precisão possível nos resultados obtidos (Valgas, 2002).

Conceitos teóricos relativos à difusão são importantes para o entendimento de fatores de interferência. Para um melhor entendimento dos fatores, seguem alguns conceitos, conforme Lourenço (2006):

- Zona limítrofe: é a região na qual ocorre a difusão do produto testado, porém a concentração não é suficiente para gerar halo de inibição.

- População do inóculo: é a população microbiana no momento da inoculação.
- Tempo (t_0): é o período de crescimento do microorganismo até que seja alcançada a população crítica.
- População crítica: é a população microbiana no tempo (t_0), no qual ainda não foi atingida a população inibitória. Um crescimento além da população crítica resulta numa quantidade de microorganismos capazes de absorver completamente o produto testado, impedindo uma maior difusão.
- População inibitória: é a população microbiana que é grande o suficiente para impedir completamente a formação de zonas de inibição.
- Concentração crítica: é a concentração do produto na posição limítrofe entre o crescimento e a inibição.
- Fase *lag*: fase de crescimento lenta dos microorganismos. São os primeiros momentos da incubação, fase da segunda ou terceira geração.

Os fatores que interferem na formação dos halos de inibição são a concentração crítica e a população crítica. No entanto, os fatores que influenciam na difusão do produto e no tempo para atingir a concentração crítica também agem como inibidores (Lourenço, 2006).

A carga microbiana inicial e o tempo da fase *lag* do microorganismo relacionadas com a velocidade de difusão da substância no ágar são determinantes para o tamanho do halo de inibição. Por isto, o tempo da pré-difusão é importante, pois a temperatura é mantida abaixo da temperatura ideal de crescimento do microorganismo, permitindo que a difusão do produto atinja uma área maior no ágar.

Fatores operacionais não muito bem estabelecidos como, por exemplo, a espessura e uniformidade da camada do meio de cultura, tendo em vista que a difusão ocorre de forma radial (figuras 3.7, 3.8 e 3.9), também influenciam decisivamente na formação dos halos, na homogeneidade da distribuição dos microorganismos testados e na visualização do resultado, contribuindo para que o método não seja reproduzível e sensível. A temperatura do meio de cultura fundido deve ser mantida entre 42 e 44 °C. Temperaturas superiores a 44 °C podem inativar os microorganismos e inferiores a 42 °C podem gerar grumos no meio de cultura. O ajuste dos volumes para a camada base e para a camada que forma a capa que recobre a placa cromatográfica é essencial para manter as espessuras das camadas.

A variação da espessura da capa de ágar sobre a CCD influencia na área dos halos. A formação de bolhas dificulta a visualização, o que pode ser evitado pela agitação circular na inoculação e pela adição de uma camada base como “berço” para a placa de CCD.

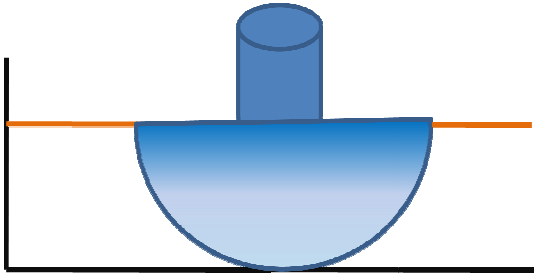


Figura 3.7.: Difusão radial. (Fonte: autor)

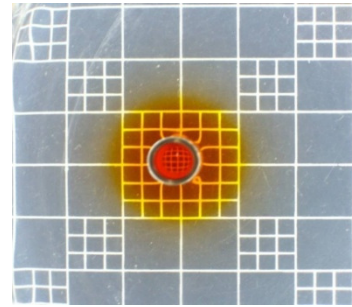


Figura 3.8.: Difusão radial. (Fonte: autor)

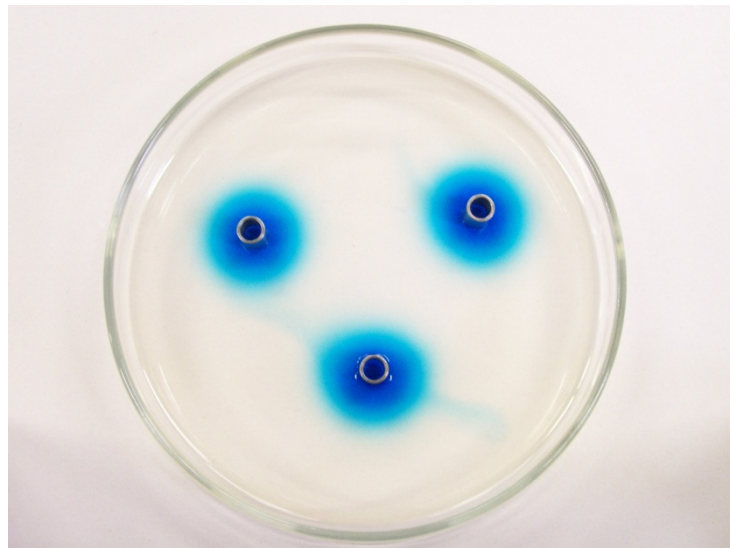


Figura 3.9.: Difusão radial: diferenças da concentração nas extremidades do halo em relação ao centro indicada pelas nuances da coloração azul. (Fonte: autor)

4. METODOLOGIA

Pesquisa, segundo Cooper (2004), é um estudo com o objetivo de desenvolver conhecimento e habilidades para encontrar soluções a problemas e desafios. Ainda de acordo com o autor, o planejamento de uma pesquisa se constitui em um plano e estruturação de uma investigação de forma a coletar, mensurar, analisar e elucidar respostas para questões da pesquisa ou experimento. Gil (1993) classifica as pesquisas em três grandes grupos, de acordo com os objetivos gerais em: exploratórias, descritivas e explicativas. Para o estudo em questão, a pesquisa explicativa é a que melhor se ajusta aos objetivos deste trabalho, por identificar através do método experimental, os fatores que determinam, influenciam ou contribuem para os fenômenos ocorridos. Ainda, segundo Gil (1993), a pesquisa experimental estabelece um objeto de estudo, onde são selecionadas variáveis capazes de influenciar o estudo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que tal (is) variável (is) produz (em) no objeto de estudo.

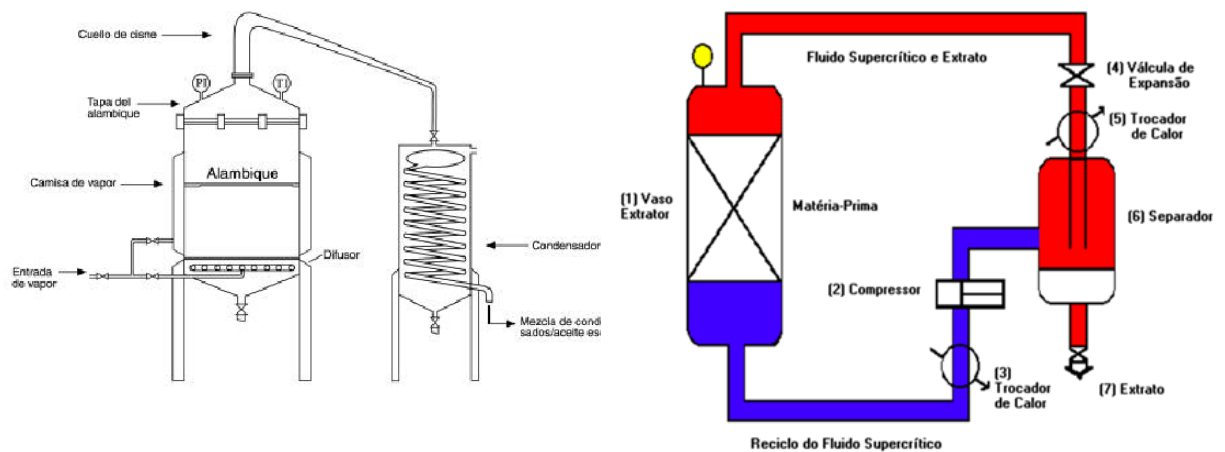
4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Óleo Essencial

Para este trabalho foram selecionados os óleos essenciais das seguintes espécies: *Rosmarinus officinalis* L (Alecrim), *Cymbopogum citratus* DC. Stapf (Capim Limão), *Cymbopogum winterianus* Jowitt (Citronela). A escolha se deve pela vasta literatura sobre a atividade antimicrobiana desses óleos (Santoyo, 2004; Lima 2006) e pelo fato da empresa Tekton Óleos Essenciais ser parceira no desenvolvimento desta dissertação e estar geograficamente perto, localizada em Viamão – RS, região metropolitana de Porto Alegre. A empresa forneceu as plantas aromáticas das espécies citadas anteriormente para a extração com CO₂ supercrítico (figura 4.2) na pressão de 150 bar e 60 °C de temperatura e por destilação por arraste a vapor (figura 4.1). Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da Faculdade de Engenharia da PUCRS (figura 4.3) e seguiram as metodologias e equipamentos descritos por Cassel *et al.* (2008) e Cassel *et al.* (2009),

respectivamente para os processos de destilação por arraste a vapor e extração supercrítica.

As análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa – CG-MS foram também realizadas no LOPE. O equipamento utilizado é da marca Agilent Technologies, modelo 7890A CG system, equipado com um processador de dados. Coluna capilar HP – 5 MS (30 m de comprimento x 0,250 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura), 60°C por 4 minutos com incremento de 3°C por minuto até 240°C de temperatura. Hélio é o gás de arraste utilizado. As análises no MS foram realizadas em equipamento da marca Agilent Technologies, modelo 5975C VL MSD, operando em 70 eV, e a temperatura da fonte de íon mantida em 250°C. O volume injetado foi de 5 µL de amostra diluída (1:1) em n-hexano, em cada análise. A biblioteca de espectros de identificação de compostos foi desenvolvida por Adams (2007).



extração por
di, 2001)

Extração Supercrítica
cha, L. M., 2008)



Figura 4.3 Unidade Piloto de Extração Supercrítica do LOPE (Fonte: autor)

4.1.2. Microorganismos

Os microorganismos testados foram selecionados, principalmente, em função da Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988 da ANVISA, que indica no subanexo 2 (Quadro 4.1) os microorganismos que devem ser testados para classificar produtos como saneantes. Também outras cepas foram adquiridas para completar o leque de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e leveduras (Quadro 4.2). As cepas são padronizadas exceto o *Aspergillus niger* que foi coletado e identificado.

Quadro 4.1. - Portaria nº 15 da ANVISA: Microorganismo para avaliação da ação antimicrobiana.

CLASSE		MICROORGANISMOS
A	Desodorizantes:	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Salmonella choleraesuis</i> .
B	Desinfetantes para uso geral:	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Salmonella choleraesuis</i> .
C	Desinfetantes para indústria alimentícia:	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> .
D	Desinfetantes para piscinas:	<i>Streptococcus faecalis</i> e <i>Escherichia coli</i> .
E	Desinfetantes para lactários:	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Salmonella choleraesuis</i>
F	Desinfetantes hospitalares p/ superfícies fixas:	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> e <i>Pseudomas aeruginosa</i>
G	Desinfetantes hospitalares p/ artigos semi-críticos:	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Pseudomas aeruginosa</i> , <i>Tricophyton mentagrophytes</i> , <i>Mycobacterium amegmatis</i> e <i>Myctobacterium bovis</i> .
H	Esterilizantes:	<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Clostridium sporogenes</i> (esporos).

Quadro 4.2. - Microorganismos utilizados nos testes.

Morfologia	Microorganismos
Bactérias	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC: 9341
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC: 29212
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC: 06633
	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922
Gram-negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
	<i>Salmonella typhymurium</i> ATCC: 14028
	<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC: 10708
Fungos	Leveduriformes <i>Candida albicans</i> ATCC 28367
	Filamentosos <i>Aspergillus níger wild</i>

4.1.3. Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana

Pelo método da bioautografia se avalia qualitativamente a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente aos microorganismos (Valgas, 2002). É um teste simples que permite uma triagem inicial para dar continuidade ou não na pesquisa com o óleo testado. Os testes foram realizados na Faculdade de Farmácia da PUCRS. Na bioautografia indireta, conforme protocolo desenvolvido no curso de extensão em métodos bioautográficos (Bertucci, 2009), o óleo essencial é aplicado na placa cromatográfica de camada delgada (CCD) e é feito um cromatograma. A fase móvel, por evaporação, deve ser eliminada. O inóculo utilizado é: o tubo 0,5 da Escala Mac Farland (1×10^8 UFC/mL) para bactérias; para levedura, o tubo 3 da escala (9×10^8 UFC/mL) e, quando fungos, usa-se 1×10^7 UFC/mL. O controle negativo é feito com solvente e o positivo com antibiótico de atividade antimicrobiana conhecida. O meio de cultura Mueller Hinton, padronizado por Kirby e Bauer e pelo NCCLS, oferece condições de crescimento para as principais bactérias (ANVISA, módulo IV) e ágar Sabouraud-Glicose para fungos e leveduras. Os meios de cultura adequados ao microorganismo são inoculados nas concentrações acima citadas. O inóculo é vertido em placas de Petry, contendo os cromatogramas dos óleos em CCD e estes são levados para encubar em estufa a 36°C e 35% de umidade, por 24 horas para bactérias e a 25°C por 48 horas para fungos e leveduras. Após, utiliza-se um revelador de sal de tetrazólio, o “*p*-iodonitrotetrazolium violet” (INT), que permite visualizar de forma fácil as áreas de inibição do crescimento microbiológico, como se observa na figura 4.4. Os testes foram realizados em triplicata.

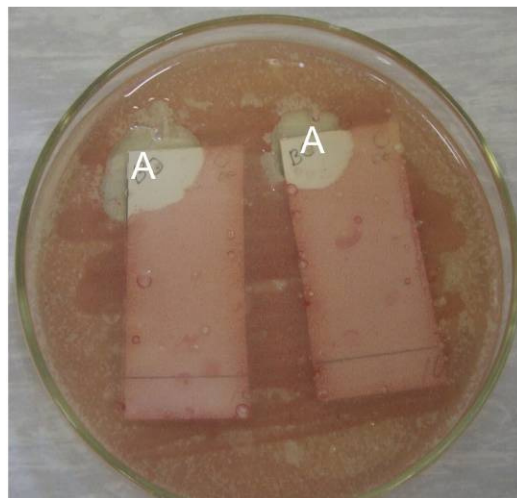


Figura 4.4.: Aplicação do revelador: Área de inibição (A). (Fonte: autor)

4.1.4. Avaliação dos emulsionantes dos óleos essenciais

Para avaliar a solubilidade dos óleos essenciais foram utilizados os seguintes compostos emulsionantes: dimetilsulfóxido (DMSO), TWEEN 80, acetona e TWEEN 20. O teste consiste em avaliar se os emulsionantes têm atividade antimicrobiana, interferindo diretamente nos resultados ou potencializando o resultado dos testes. Os ensaios preliminares foram feitos com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) extraído por destilação por arraste a vapor. A concentração de emulsionante variou entre 20% e 40% em água estéril e testada em tubos com os microorganismos. Aos tubos estéreis, foram adicionados 1 mL da solução emulsionante e 1 mL do meio de cultura inoculado com microorganismos. Também foi testada a fertilidade do meio de cultura em tubos com 1 mL de água estéril e 1 mL do meio de cultura inoculado com microorganismos.

4.1.5. Preparação do inóculo

Os microorganismos são fornecidos liofilizados, acondicionados em ampolas, que são abertas de forma asséptica. Os microorganismos liofilizados são adicionados em caldo nutritivo para se promover o seu crescimento. Após, estes são repicados para placas de Petry e o caldo armazenado em freezer para uso posterior.

Para o isolamento do microorganismo se replica do meio nutritivo de crescimento para uma placa contendo o meio de cultura ágar Caseína-Soja para bactérias e ágar Sabouraud para fungos. O crescimento é realizado em uma estufa por 24 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ para bactérias e por 48 horas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ para fungos.

Para padronizar a densidade do inóculo usa-se o controle da turbidez de sulfato de bário, equivalente a escala de Mac Farland (NCCLS, 2003). A densidade óptica correta deve ser verificada em um espectrofotômetro na escala de 625 nm. As soluções padrões da escala Mac Farland podem ser preparadas misturando-se as soluções de BaCl_2 0,048 M e de H_2SO_4 0,18 M nos volumes indicados na tabela 4.1. Ao se obter a leitura no espectrofotômetro do tubo da escala de Mac Farland referente à densidade do inóculo que corresponde às unidades formadoras de colônias (UFC) desejadas, procede-se, em outro tubo, à adição do microorganismo, até que a turvação seja numericamente igual à produzida pelo tubo da escala.

Tabela 4.1. - Escala de Mac Farland

Tubos	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaCl ₂ (mL)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
H ₂ SO ₄ (mL)	9,95	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0
UFC x 10 ⁸ /mL	1,5	3,0	6,0	9,0	12	15	18	21	24	27	30

Após o isolamento, as colônias serão repicadas em solução fisiológica estéril, a fim de se obter uma densidade óptica comparável ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland com a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. (Antunes, 1995). Para fungos, o tubo 3 da escala de Mac Farland se mostrou mais adequado e para fungos filamentosos a contagem é feita em câmara de Neubauer para se obter uma concentração de 10^7 esporos/mL. Em seguida, a suspensão é diluída para se alcançar a concentração de trabalho.

4.1.6. Ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Este ensaio se deu através da técnica de diluição em tubos. Portanto, em cada tubo, previamente esterilizado, é adicionada a suspensão do inóculo de cada bactéria ou fungo, que por sua vez, já contém caldo Caseína-Soja ou Sabouraud, acrescida das diferentes concentrações finais de óleo essencial solubilizado com TWEEN 20. Os tubos são incubados a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 24 horas para bactérias e $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas para fungos em estufa. Controles são realizados contendo meio de cultura sem o microorganismo que servem como controle negativo, indicando a esterilidade. O meio de cultura com o microorganismo que serve como controle positivo indicará a fertilidade do meio. O meio de cultura com o microorganismo acrescido de TWEEN 20 serve como controle do solvente. Os testes são realizados em triplicata. A CIM é a concentração de óleo mais baixa a não apresentar turvação perceptível a olho nú, ou seja, a inibir o crescimento dos microorganismos. Para verificar se esta inibição foi causada pela morte ou pela inativação se faz o plaqueamento com alça calibrada. A concentração inicial para determinação da CIM foi de 160mg/mL no primeiro tubo e nos posteriores de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 e 1,25

mg/mL. Tubos contendo apenas o emulsionante, TWEEN 20, e água estéril foram utilizados como controle da interferência do emulsionante no crescimento do microorganismo e outros tubos apenas com o inóculo e o meio de cultura para verificar a fertilidade do meio.

4.1.7. Técnica de difusão em ágar: Variante bioautografia indireta

A técnica de difusão utilizada neste trabalho é a bioautografia indireta ou também chamada de capa de ágar (*agar overlay*). Os óleos essenciais de alecrim, capim limão e citronela foram aplicados sobre placas de sílica gel GF₂₅₄ para fazer a cromatografia em camada delgada (CCD). Como fase móvel foram utilizados: tolueno e acetato de etila (93:7) (Wagner e Blatt, 1995). Ao término da cromatografia as placas foram aeradas para eliminar os solventes. Concomitantemente, o inóculo é preparado conforme descrito na seção 4.1.5 e diluído até a concentração de trabalho. O inóculo é vertido na placa de Petry 90 x 15 mm para formar a camada base ou “berço de ancoragem” da placa de CCD. Esta é colocada sobre a base de forma que fique sobre a superfície e, após, é vertida a camada superficial do inóculo, de modo a formar uma película fina sobre a placa de CCD. As placas ficam em pré-incubação e então são colocadas em estufa 36 ± 1 °C por 20 horas para bactérias e a 25°C por 40 horas para fungos. Ao término do tempo de incubação, é aplicado o revelador INT. A figura 4.5 representa graficamente os passos da bioautografia indireta.

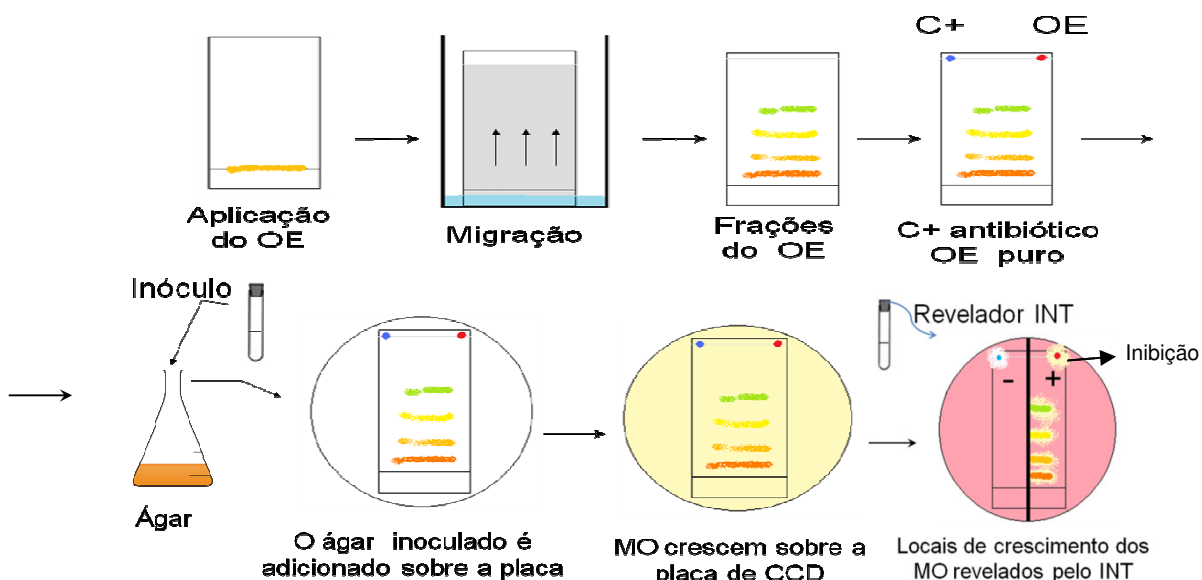


Figura 4.5.: Bioautografia indireta. (Fonte: autor e Falcão, M. A.)

Após identificar as frações que têm atividade antimicrobiana é calculado o índice de retenção (IR), que é a razão entre distância percorrida pelo solvente e a distância percorrida pela fração, de cada halo de inibição com o uso de um paquímetro (figura 4.6). O valor calculado do IR é usado para definir qual região da placa se deve raspar, região onde se encontram os compostos, retirar as sílicas e identificar a composição da fração. Como controle positivo de inibição foram aplicados padrões de antibióticos a fim de verificar a resposta do microorganismo, se resistente ou sensível a Amoxicilina (padrão do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - potência com $850\mu\text{g}/\text{mg}$) e ao Cetoconazol (SREENIVASA PHARMA). A concentração de padrão usada foi de $4\mu\text{g}/\text{mL}$.

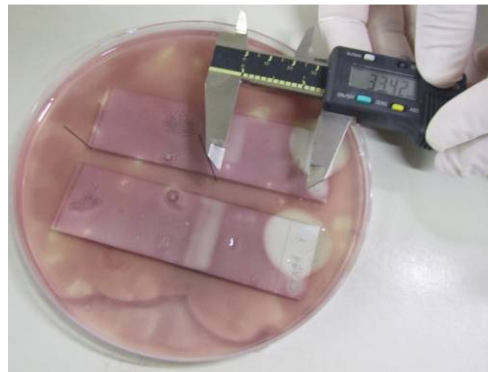


Figura 4.6.: Medidas das distâncias para calcular o IR. (Fonte: autor e Falcão, M. A.)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resultados preliminares

Através dos resultados preliminares encontrados foi possível definir os parâmetros de trabalho como: o emulsionante, a quantidade de microorganismos e volume de inóculo, as temperaturas e os tempos a serem utilizados nos testes.

Os primeiros testes foram realizados com óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) extraído por arraste a vapor e doado pela empresa TEKTON Óleos Essenciais. A etapa inicial consistiu na definição do solvente/emulsionante a ser utilizado. A maioria das referências bibliográficas consultadas (Sabulal, 2007; Rossi, 2007; Kürkçüoğlu, 2007) utiliza o dimetilsulfoxido (DMSO) como solvente/emulsionante, porém nos testes realizados este apresentou formação de halo de inibição. Mesmo com a substituição de fornecedor do DMSO continuou a ocorrer a interferência do solvente. Concluiu-se que algum resíduo de síntese, contaminação ou ainda o não domínio de uma técnica adequada, impediu a reprodução de dados bibliográficos consultados.

Os resultados mais interessantes foram obtidos com o solvente/emulsionante TWEEN 20. Os testes realizados com 20% e 40% de TWEEN 20 em água estéril demonstraram não inibir o crescimento; porém na concentração de 40% se observou uma influência na velocidade de crescimento. O tempo necessário para atingir a população crítica foi o dobro do necessário para a concentração de 20%. Sendo estabelecido, então, que o TWEEN 20 na concentração de 20% seria o solvente/emulsionante mais indicado para os testes.

Testes realizados em placa de Petry, para definir a população do inóculo, ou seja, a carga inicial de microorganismo na bioautografia, indicaram a concentração ideal de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL para bactérias, de $9,0 \times 10^6$ UFC/mL para fungos e de $1,0 \times 10^5$ esporos/mL para fungos filamentosos em placas de Petry, tamanho 90 x 15 mm. A placa de CCD foi colocada sobre uma camada base ou “berço de ancoragem” de forma que fique fixa na superfície e, após, é vertida a camada superficial do inóculo, 15 mL, de modo a formar uma película fina sobre a placa de CCD. Por uma hora as placas ficam em pré-incubação, à temperatura ambiente, e então são colocadas em estufa a 36 ± 1 °C por 20 horas para bactérias e a 25°C por 40 horas para fungos.

Para a concentração inibitória mínima, os testes indicaram a concentração de 2×10^4 UFC/mL do inóculo a ser adicionada nos tubos e igual volume do óleo essencial emulsionado. Considerando a diluição 1:1, a concentração final de trabalho para bactérias e fungos ficou em $1,0 \times 10^4$ UFC/mL. Esta carga microbiana inicial permite, para o teste de plaqueamento com alça calibrada de $10 \mu\text{L}$, uma quantidade de 100 a 150 UFC na placa (figura 5.1). Esta quantidade de colônias pode ser facilmente contada com auxílio de um contador de colônias, diferentemente do que ocorre para concentrações maiores (figura 5.2). O volume usado foi de $1000 \mu\text{L}$ da suspensão do inóculo de cada bactéria ou fungo na concentração de $2,0 \times 10^4$ UFC/mL e $1000 \mu\text{L}$ de óleo solubilizado com TWEEN 20 nas concentrações de 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 e $1,25 \text{ mg/mL}$, sendo o volume completado com caldo Caseína-Soja ou Sabouraud. A concentração final do inóculo, considerando a diluição no tubo, foi de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL e o volume final em cada tubo foi de $2000 \mu\text{L}$. Os tubos foram incubados à $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 20 horas para bactérias e à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 40 horas para fungos.



Figura 5.1.: E. Coli : $10 \mu\text{L}$ de 1×10^4 UFC/mL.
(Fonte: autor e Falcão, M. A.)

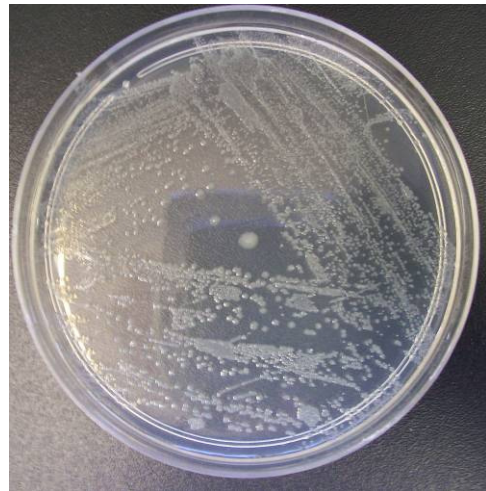


Figura 5.2.: E. Coli : $10 \mu\text{L}$ de 1×10^8 UFC/mL.
(Fonte: autor e Falcão, M. A.)

5.2. Resultados comparativos preliminares da atividade antimicrobiana de óleos extraídos por arraste a vapor e extração supercrítica

Os óleos essenciais de alecrim e citronela extraídos pelos processos de destilação por arraste a vapor e por extração com dióxido de carbono supercrítico, foram aplicados sobre placas de CCD para fazer a cromatografia em camada delgada (vide item 4.1.7.). O óleo de capim limão não foi testado neste experimento,

pois não foi possível obter as amostras das plantas para extração por supercrítico. Como fase móvel foram utilizados tolueno e acetato de etila (93:7). Ao término da cromatografia, os inóculos dos microorganismos (MO), *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (ML) e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (ST), *Candida albicans* ATCC 28367 (CA) e o *Aspergillus niger wild* (AN) foram vertidos individualmente sobre cada placa de CCD. As placas de Petry com as CCD foram incubadas em estufa. Conforme se observa nas placas cromatográficas (figuras 5.3 e 5.4), reveladas com vanilina sulfúrica, é visível que o processo extrativo influi significativamente na composição do OE (tabela 5.1), conseqüentemente, na ação antimicrobiana. A análise cromatográfica, por CG/MS, forneceu as seguintes composições para os componentes majoritários dos óleos essenciais:

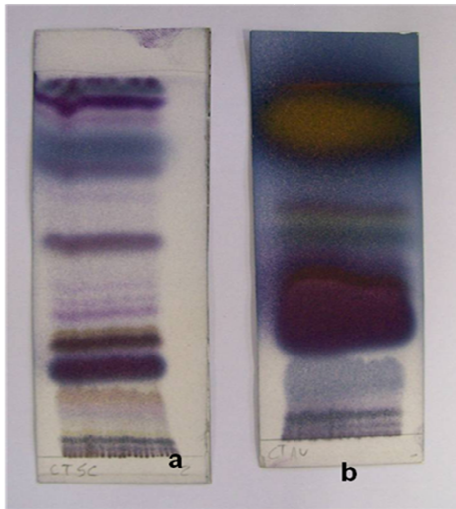


Figura 5.3.:Citronela Supercrítico(a) e arraste a vapor(b).
(Fonte: autor)

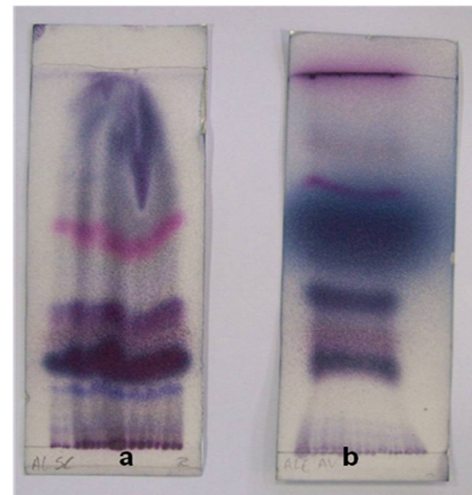


Figura 5.4. :Alecrim Supercrítico(a) e arraste a vapor(b).
(Fonte: autor)

Tabela 5.1 - Concentrações dos componentes majoritários dos OE supercrítico e arraste a vapor

Alecrim arraste a vapor (AV): α -pineno (16,3%) e cineol (19,9%);
Alecrim supercrítico (SC): geraniol (33,4%) e verbenona (29,9%);
Citronela arraste a vapor (AV): citronelal (35,4%) e citronelol (18,5%);
Citronela supercrítico (SC): geraniol (35,6%) e citronelal (15,2%).

O fracionamento ocorrido na CCD e a atividade antimicrobiana na fração (F) ou no óleo essencial (O) ou em ambos permitiu identificar se a ação do óleo é sinérgica ou específica, cruzando os resultados obtidos (tabela 5.2).

Tabela 5.2. - Resultados da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de citronela e alecrim extraídos com CO₂ supercrítico (SC) e por arraste a vapor (AV).

Óleo Essencial	<i>M. lúteos</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella typhym.</i>
Citronela (SC)	+(F;O)	-	-	-	-	-
Citronela (AV)	-	+ (F)	+ (F;O)	+ (F;O)	+ (O)	-
Alecrim (SC)	+ (O)	+ (O)	-	-	+ (F;O)	-
Alecrim (AV)	-	-	+ (O)	-	+ (O)	-

Legenda: (+) inibição de crescimento do MO; (-) não houve inibição do MO; (F) inibição na fração um dos constituintes do óleo; (O) inibição do óleo puro com todos os constituintes.

Comparando os resultados para a citronela, observa-se que a diferença na composição química, fruto da influência do processo extrativo, influenciou na ação antimicrobiana frente ao *M. luteus*. O óleo extraído por supercrítico teve ação frente ao *M. luteus* e o óleo extraído por arraste a vapor não. Porém, o óleo de citronela (AV) teve ação antimicrobiana para *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger* e *S. aureus* enquanto o óleo extraído por supercrítico não teve ação frente a estes microorganismos. O resultado do óleo de citronela (AV) que apresentou ação apenas na fração frente a *E. coli*, pode indicar antagonismo, ou seja, produtos que em conjunto se anulam em termos de atividade antimicrobiana ou quantidade de produtos na fração que permite a atividade antimicrobiana. Diferentemente quando o óleo de citronela (AV) apresentou ação antimicrobiana para *S. aureus* e as frações do óleo não foram ativas para este microorganismo, indicando sinergismo de seus compostos. A ação deste óleo tanto na fração como no óleo para *C. albicans* e *A. niger* pode indicar que um ou mais compostos são responsáveis por esta atividade.

Quanto ao OE de alecrim, se observa que tanto o óleo extraído por supercrítico quanto o extraído por arraste a vapor atuaram de forma a evidenciar sinergismo de seus compostos, pois o óleo teve ação e as frações não. Apenas uma fração do óleo de alecrim (SC) apresentou ação para *S. aureus*, o que pode indicar que um ou mais compostos foram extraídos pelo processo supercrítico, mas não pelo método de arraste a vapor.

Para a *Salmonella typhimurium* nenhum dos óleos testados neste experimento comparativo teve ação inibidora, independentemente do processo de extração utilizado.

Os resultados destes experimentos foram apresentados no V Congresso Brasileiro de Óleos Essenciais em setembro de 2009, no Rio de Janeiro.

Para a continuidade dos estudos comparativos, seria necessário um volume de óleo essencial extraído por supercrítico o que não foi possível devido à dificuldade na sua obtenção e das plantas para extração. Sendo assim, optou-se por continuar a realizar os testes apenas com os óleos essenciais obtidos através da extração por arraste a vapor.

5.3. Resultados da atividade antimicrobiana de óleos extraídos por arraste a vapor

Pelo método de bioautografia indireta, descrita no item 4.1.7, testamos os óleos *Rosmarinus officinalis* L, *Cymbopogum citratus* DC. Stapf, *Cymbopogum winterianus* Jowitt, frente aos microorganismos citados na tabela 4.2 do item 4.1.2. E pelo método de diluição em tubos, descrito no item 4.1.6 foram testados os óleos *Cymbopogum citratus* DC. Stapf, *Cymbopogum winterianus* Jowitt contra os microorganismos citados no quadro 4.1 para as classes de A a F (ANVISA) e *Candida albicans*.

5.3.1. Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

Os resultados obtidos para este óleo essencial indicaram uma atividade antimicrobiana do óleo essencial, ou seja, do conjunto de compostos presentes no mesmo, indicando um possível sinergismo entre seus compostos para terem ação antimicrobiana. As frações não apresentaram ação contra fungos e bactérias.

Os microorganismos para os quais o óleo essencial de alecrim foi efetivo são: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 28367. Os resultados podem ser visualizados na tabela 5.3.

Pelos resultados obtidos, não é possível enquadrar o óleo de alecrim nas classes da Portaria 15 da ANVISA de 23 de agosto de 1988. Portanto, não foi dada continuidade à avaliação do potencial antimicrobiano deste composto, pois não seria

possível o registro de um produto saneante de ação antimicrobiana, segundo a legislação vigente.

5.3.2. Óleo essencial de *Cymbopogum citratus* DC. Stapf

5.3.2.1 Resultado da bioautografia e da análise cromatográfica.

Para o óleo essencial de capim limão a atividade antimicrobiana foi positiva contra os microorganismos testados, exceto a *Salmonella typhimurium* ATCC: 14028. Frente a *Escherichia coli* ATCC: 25922 o óleo foi ativo, porém suas frações não. Para o *Micrococcus luteus* ATCC: 9341 e *Pseudomonas aeruginosas* ATCC: 27853 o óleo não foi efetivo, porém as frações tiveram ação antimicrobiana. Na tabela 5.4 estão os resultados da bioautografia. O “Índice de Retenção da Fração” (IR F) foi calculado dividindo-se o percurso do eluente, do ponto de aplicação do óleo até a altura máxima do eluente (*start-front*) pelo percurso da fração. Para alguns microorganismos houve até 04 frações ativas dentro de um mesmo óleo, porém foram escolhidas as duas faixas de IR que representavam a ação mais efetiva das frações. Este índice nos permitiu identificar em qual área da placa cromatográfica estava o composto ou compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana. Então, a placa foi levada à luz ultravioleta 254 nm para marcar a área exata da substancia, permitindo que a sílica fosse retirada na região indicada pelo IR F e encaminhada para análise por CG/MS.

Pelos resultados obtidos, foi possível enquadrar o óleo de capim limão nas classes A, B, C, D e E da Portaria 15 da ANVISA de 23 de agosto de 1988. As faixas que mais representaram a atividade do óleo essencial são duas e se situam entre os índices de retenção 0,52 a 0,60 e 0,61 a 0,75, chamadas de F1 e F2 respectivamente. A análise do óleo (tabela 5.5) e das frações (tabelas 5.6 e 5.7) indicou os compostos mais promissores (figura 5.5) para combater esses microorganismos.

Tabela 5.3. - Resultados da bioautografia do óleo de alecrim

Alecrim	<i>ST. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>PS. aeruginosas</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Bac. subtilis</i>	<i>A. niger</i>	<i>Sal. choleraesuis</i>	<i>Enter. faecalis</i>	<i>Sa. typhymurium</i>
Óleo	sim	não	não	não	sim	não	não	não	não	não
fração	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
Padrão	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
IR F:	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não

Tabela 5.4. - Resultados da bioautografia do óleo de capim limão

Cap. Limão	<i>ST. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>PS. aeruginosas</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Bac. subtilis</i>	<i>A. niger</i>	<i>Sal. choleraesuis</i>	<i>Enter. faecalis</i>	<i>Sa. typhymurium</i>
óleo	sim	sim	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	não
fração	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não
Padrão	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
IR F1			0,528	0,555		0,53	0,60	0,59	0,615	
IR F2	0,655				0,61					
IR F3					0,021	0,28		0,041	0,0499	
IR F4									0,172	
IR F5									0,337	

Tabela 5.5 - Análise por CG/MS do óleo de Capim Limão

% Area	TR (min)	Composto	IK	IK teórico
0,112%	7,344	alpha-pinene	928	932
1,352%	10,235	6-methyl-5-hepten-2-one	986	981
0,643%	10,444	Myrcene	990	988
0,065%	12,278	ortho-cymene	1023	1022
0,140%	12,501	Limonene	1027	1024
1,068%	12,620	1,8-cineole	1029	1026
0,432%	15,882	Fenchone	1086	1083
1,614%	16,730	Linalool	1100	1095
0,187%	17,340	endo-fenchol	1111	1114
0,591%	18,992	Camphor	1141	1141
0,230%	19,682	Citronellal	1154	1148
0,224%	20,330	cis-chrysanthenol	1165	1160
0,182%	20,897	Borneol	1176	1165
0,478%	23,921	Citronellol	1233	1223
29,557%	24,568	Neral	1246	1235
0,225%	24,997	Piperitone	1254	1249
2,335%	25,259	Geraniol	1259	1249
42,783%	26,192	Geranial	1278	1264
1,390%	27,073	2-undecanone	1295	1293
0,906%	27,478	geranyl formate	1303	1298
0,606%	31,344	geranyl acetate	1384	1379
0,061%	32,835	E-caryophyllene	1417	1417
0,233%	33,625	alpha-trans-bergamotene	1434	1432
0,336%	40,026	caryophyllene oxide	1579	1582
85,751%				

Tabela 5.6
Fração F1 Capim Limão (IR 0,52 a 0,60).

% Area	TR (min)	Composto
13,215%	10,5009	ortho-cymene
19,383%	10,6792	limonene
25,503%	10,7818	1,8-cineole
11,046%	20,7917	neral
17,465%	22,2178	geranial
86,612%		

Tabela 5.7
Fração F2 Capim Limão (IR 0,61 a 0,75).

% Area	TR (min)	Composto
6,687%	10,6684	limonene
7,790%	10,7872	1,8-cineole
39,691%	20,8079	neral
45,832%	22,234	geranial
100,000%		

Avaliando os resultados das frações pode-se observar que na fração F1 está presente o composto o-cimeno e na fração F2 não. Porém a fração F2 contém três vezes mais citral (neral + geranial) que a fração F1.

5.3.2.2 Resultado da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima para o óleo essencial de capim limão foi realizada com 07 concentrações diferentes, partindo do balão volumétrico inicial com concentração de 161,1 mg/mL. Procedeu-se as diluições na proporção de 1:1 e se obteve as seguintes concentrações nos tubos: 80,55; 40,28; 20,14; 10,07; 5,03; 2,52; 1,26 mg/mL.

A diluição com o TWEEN 20 ficou opaca para concentrações superiores a 5 mg/mL, o que dificultou a visualização nos tubos onde aconteceram crescimentos dos microorganismos. O plaqueamento em ágar Mueller Hinton com alça calibrada de 10 µL permitiu verificar se a atividade inibitória foi por morte dos microorganismos ou se foi pela inativação do crescimento, quando a quantidade de microorganismo manteve a carga microbiana inicial. O tempo do experimento foi de 120 horas com leituras da turvação no primeiro tempo de leitura estabelecido para os microorganismos testados. Os microorganismos foram escolhidos com base na Portaria 15 da ANVISA de 1988 para as classes de A a F e acrescidos de *Candida albicans*.

A *Salmonella choleraesuis* ATCC: 10708 teve turvação no tubo de concentração 1,26 e 2,52mg/mL nas leituras de 20h. Após 120h, houve crescimento de mais de 300 UFC. Nas concentrações superiores não houve crescimento.

Para o *Enterococcus faecalis* ATCC: 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, nas primeiras 20h, ocorreu turvação no tubo de concentração de 1,26mg/mL e turvação após 40h no tubo de concentração 2,52mg/mL. Após 120h ocorreu o plaqueamento e houve crescimento de mais de 300UFC na concentração de 1,26mg/mL, em ambos os microorganismos. Porém, ocorreu apenas 1 UFC no plaqueamento do *Enterococcus faecalis* do tubo com concentração de 2,52mg/mL e 38 UFC no tubo de concentração de 2,52mg/mL do *Staphylococcus aureus*. O aparente crescimento nas concentrações de 2,52mg/mL pode ter sido confundido com a turvação gerada na solubilidade. Nas demais concentrações não houve crescimento, exceto na concentração de 5,03 mg/mL para *S. aureus* com crescimento de 16 UFC.

Pseudomonas aeruginosas ATCC: 27853 e *Escherichia coli* ATCC: 25922 - o óleo essencial de capim limão não teve ação para esses microorganismos em todas

as concentrações testadas e o crescimento em placa contabilizou mais de 300UFC em todas as concentrações.

Candida albicans ATCC: 28367 ocorreu turvação na concentração de 1,26mg/mL após 80h de incubação. No plaqueamento, após 120h, a contagem foi de 150 UFC nas concentrações de 1,26 e 2,52mg/mL. Nas demais concentrações o crescimento foi insignificante.

Os dados completos estão na tabela 5.8, onde a palavra “sim” significa que houve crescimento do microorganismo e a palavra “não” significa que não houve crescimento microbiano. O “ * “ indica que ocorreu turvação, o que impossibilitou a visualização nas concentrações maiores que 5 mg/mL.



Figura 5.5.: CCD do óleo essencial de capim limão com a atividade do óleo e da fração. (Fonte: autor)

Tabela 5.8 - Concentração inibitória mínima para óleo de capim limão

	tubo1	tubo2	tubo3	tubo4	tubo5	tubo6	tubo7	
<i>Sal. choleraesuis</i>	80,55	40,28	20,14	10,07	5,03	2,52	1,26	(mg/mL)
20 horas	*	*	*	*	*	sim	sim	
40 horas	*	*	*	*	*	sim	sim	
120 horas	*	*	*	*	*	sim	sim	
Contagem (UFC)	0	11	0	0	0	>300	>300	
<i>Ent. faecalis</i>	80,55	40,28	20,14	10,07	5,03	2,52	1,26	(mg/mL)
20 horas	*	*	*	*	*	não	sim	
40 horas	*	*	*	*	*	sim	sim	
120 horas	*	*	*	*	*	sim	sim	
Contagem (UFC)	0	0	0	1	0	1	>300	
<i>Staphylococcus aureus</i>	80,55	40,28	20,14	10,07	5,03	2,52	1,26	(mg/mL)
20horas	*	*	*	*	*	não	sim	
40 horas	*	*	*	*	*	sim	sim	
120 horas	*	*	*	*	*	sim	sim	
Contagem (UFC)	0	0	0	0	16	38	>300	
<i>Ps. aeruginosas</i>	80,55	40,28	20,14	10,07	5,03	2,52	1,26	(mg/mL)
20horas	*	*	*	sim	sim	sim	sim	
40horas	*	*	*	sim	sim	sim	sim	
120 horas	*	sim	sim	sim	sim	sim	sim	
Contagem (UFC)	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	
<i>Escherichia coli</i>	80,55	40,28	20,14	10,07	5,03	2,52	1,26	(mg/mL)
20horas	*	*	*	*	*	sim	sim	
40 horas	*	*	*	*	*	sim	sim	
120 horas	*	*	*	*	*	sim	sim	
Contagem (UFC)	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	
<i>Candida albicans</i>	80,55	40,28	20,14	10,07	5,03	2,52	1,26	(mg/mL)
40horas	*	*	*	*	*	não	não	
80horas	*	*	*	*	*	não	sim	
120 horas	*	*	*	*	*	não	sim	
Contagem (UFC)	0	0	0	22	3	150	150	

* Solubilização com TWEEN 20: para o C. Limão ocorreu turvação o que impossibilitou a visualização nas concentrações maiores que 5 mg/mL. Nos tubos 6 e 7, com 2,5 e 1,2 mg/mL a visualização foi possível.

Legenda: Sim e não" significa se houve ou não crescimento microbiano. O " * " indica que ocorreu turvação, o que impossibilitou a visualização nas concentrações maiores que 5 mg/mL.

5.3.3. Óleo essencial de *Cymbopogum winterianus* Jowitt

5.3.3.1. Resultado da bioautografia e da análise cromatográfica

Para o óleo de citronela a atividade antimicrobiana foi positiva contra os microorganismos testados, exceto para a *Salmonella typhimurium* ATCC: 14028. Frente a *Escherichia coli* ATCC: 25922, *Micrococcus luteus* ATCC: 9341, *Pseudomonas aeruginosas* ATCC: 27853 e *Bacillus subtilis* ATCC: 06633 o óleo não foi ativo, porém suas frações sim.

O “Índice de Retenção da Fração” (IR F) foi calculado dividindo-se o percurso do eluente, do ponto de aplicação do óleo até a altura máxima do eluente (*start-front*) pelo percurso da fração. Para alguns microorganismos houve até 04 frações ativas dentro de um mesmo óleo, porém escolheu-se duas faixas de IR que representavam a ação mais efetiva das frações. Este índice nos permitiu identificar em qual área da placa cromatográfica estava o composto ou compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana. Então, a placa foi levada à luz ultravioleta para marcar a área exata, permitindo que a sílica fosse retirada na região indicada pelo IR F e encaminhada para análise por CG/MS.

Avaliando-se os resultados obtidos (tabela 5.9), foi possível enquadrar o óleo de citronela nas classes A, B, e E da Portaria 15 da ANVISA de 23 de agosto de 1988. As frações que representaram a atividade do óleo essencial são duas e se situam entre os índices de retenção 0,23 a 0,27 e 0,34 a 0,41, chamadas de fração F1 e F2 respectivamente. A análise do óleo (tabela 5.10) e das frações (tabela 5.11 e 5.12) nos indica os compostos mais promissores para combater esses microorganismos.

Tabela 5.9. - Resultados da bioautografia do óleo de citronela

Citronela	<i>ST. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>PS. aeruginosas</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Bac. subtilis</i>	<i>A. niger</i>	<i>Sal. choleraesuis</i>	<i>Enter. faecalis</i>	<i>Sal. typhymurium</i>
Óleo	sim	não	Não	Não	sim	não	sim	sim	sim	não
Fração	sim	sim	Sim	Sim	sim	sim	sim	sim	sim	não
Padrão	sim	sim	Sim	Sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
IR F1				0,25		0,25				
IR F2	0,355	0,412	0,41		0,365		0,35	0,345	0,397 e 0,376	

Legenda: "Sim e não" significa se houve ou não crescimento microbiano.

Tabela 5.10 - Análise por CG/MS do óleo de Citronela

% Area	Composto	IK	IK teórico
0,052%	alpha-pinene	932	928
0,109%	myrcene	988	990
0,043%	ortho-cymene	1022	1023
1,672%	limonene	1024	1028
0,146%	1,8-cineole	1026	1029
0,928%	linalool	1095	1101
1,641%	neo-isopulegol	1145	1145
29,292%	citronellal	1148	1160
0,104%	iso-isopulegol	1155	1169
0,079%	alpha-terpineol	1186	1190
0,117%	n-decanal	1201	1206
18,859%	citronellol	1223	1236
0,253%	neral	1235	1243
16,222%	geraniol	1249	1263
0,409%	geranial	1264	1273
0,088%	citronellyl formate	1271	1277
0,161%	8-hydroxy-neo-menthol	1328	1336
4,793%	citronellyl acetate	1350	1356
0,875%	eugenol	1356	1359
2,151%	geranyl acetate	1379	1385
1,881%	beta-elemene	1389	1391
0,234%	E-caryophyllene	1417	1417
0,067%	beta-copaene	1430	1427
0,160%	alpha-humulene	1452	1451
0,387%	gamma-murolene	1478	1476
1,609%	germacrene D	1484	1480
0,136%	beta-selinene	1489	1484
0,257%	valencene	1496	1493
0,939%	alpha-murolene	1500	1499
0,547%	germacrene A	1508	1503
0,991%	gamma-cadinene	1513	1513
3,611%	delta-cadinene	1522	1523
0,210%	alpha-cadinene	1537	1536
3,183%	hedycaryol	1546	1550
0,573%	germacrene D-4-ol	1574	1574
0,888%	gamma-eudesmol	1630	1629
1,506%	epi-alpha-cadinol	1638	1639
1,040%	beta-eudesmol	1649	1647
2,342%	alpha-cadinol	1652	1652
98,553%			

Tabela 5.11.

Fração F1 Citronela (IR: 0,23-0,27).		
% Area	TR (min)	Composto
6,333%	10,5009	ortho-cymene
16,760%	10,6846	limonene
7,723%	10,798	1,8-cineole
12,043%	16,5835	citronellal
9,806%	20,2515	citronellol
17,047%	21,4939	geraniol
28,483%	29,0351	E-caryophyllene
98,195%		

Tabela 5.12.

Fração F2 Citronela (IR: 0,34-0,41).		
% Area	TR(min)	Composto
100,000%	20,2244	Citronellol

Avaliando-se os resultados das frações do óleo essencial de citronela, pode-se observar que a fração F2 é composta apenas pelo citronelol. Este composto somente não teve ação sobre os microorganismos *Pseudomonas aeruginosas* ATCC: 27853 e o *Bacillus subtilis* ATCC: 06633. A Fração F1 atuou apenas nos microorganismos *Pseudomonas aeruginosas* ATCC: 27853 e o *Bacillus subtilis* ATCC: 06633. A fração com 100% de citronelol teve ação contra 07 microorganismos e a fração F1 contra apenas 02 microorganismos, porém na somatória de todas as frações, ou seja, o óleo essencial puro teve ação contra 04 microorganismos.

5.3.3.2. Resultado da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima para o óleo essencial de citronela foi realizada com 07 concentrações, partindo-se da concentração de 159,2 mg/mL. Procedeu-se as diluições na proporção de 1:1 e se obteve as seguintes concentrações: 79,60; 39,80; 19,90; 9,95; 4,98; 2,49; 1,24 mg/mL.

A diluição com o TWEEN 20 ficou translúcida, o que facilitou a visualização nos tubos onde aconteceram crescimentos. Para verificar se a atividade inibitória foi ocasionada pela morte dos microorganismos ou pela sua inativação, as culturas foram plaqueadas em ágar Mueller Hinton com alça calibrada de 10 µL. O tempo do experimento foi de 120 horas com leituras da turvação no primeiro tempo de leitura estabelecido para os microorganismos testados. Os microorganismos foram escolhidos com base na Portaria 15 da ANVISA para as classes de A a F e acrescidos de *Candida albicans*.

A *Salmonella typhimurium* ATCC: 14028 teve turvação no tubo de concentração 2,49 mg/mL nas leituras de 20h e 40h. Após 120h, houve crescimento em todas as concentrações e o plaqueamento indicou crescimento superior a 300 UFC para todas as concentrações.

Enterococcus faecalis ATCC: 29212 teve turvação no tubo de concentração de 1,24 mg/mL nas primeiras 20h e turvação após 40h no tubo de concentração 2,49 mg/mL. Após 120h não houve alteração nas turvações. O plaqueamento indicou ação bactericida nas concentrações de 79,6 a 19,9mg/mL. Nas concentrações de 9,95 a 2,49 mg/mL houve contagem de colônias inferior a carga bacteriana inicial. Para a concentração de 1,24 mg/mL o crescimento foi superior a 300 UFC.

Staphylococcus aureus ATCC: 25923 não teve turvação no tubo de concentração de 1,24 mg/mL(menor concentração) nas primeiras 40h. Na leitura em 120h, ocorreu a turvação que foi confirmada no plaqueamento com o crescimento de mais de 300 UFC. Nas demais concentrações, não houve crescimento nas placas.

Pseudomonas aeruginosas ATCC: 27853 e *Escherichia coli* ATCC: 25922, o óleo essencial de citronela não teve ação para esses microorganismos em todas as concentrações testadas e o crescimento em placa contabilizou mais de 300UFC em todas as concentrações.

Candida albicans ATCC: 28367 ocorreu turvação na concentração de 1,24 mg/mL após 40h de incubação. No plaqueamento, após 120h, a contagem foi superior a 300 UFC. Na concentração 2,49 mg/mL não foi observado crescimento, porém o plaqueamento indicou o crescimento de 150UFC. Nas demais concentrações o crescimento foi insignificante.

Os dados completos estão na tabela 5.13, abaixo, onde a palavra “sim” significa que houve crescimento e a palavra “não” significa que não houve crescimento microbiano.

Tabela 5.13 - Concentração inibitória mínima para óleo essencial de citronela.

	tubo1	tubo2	tubo3	tubo4	tubo5	tubo6	tubo7	
<i>Sal. choleraesuis</i>	79,60	39,80	19,90	9,95	4,98	2,49	1,24	(mg/mL)
20 horas	não	não	não	não	não	sim	sim	
40 horas	não	não	não	não	não	sim	sim	
120 horas	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	
Contagem (UFC)	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	
<i>Ent. faecalis</i>	79,60	39,80	19,90	9,95	4,98	2,49	1,24	(mg/mL)
20 horas	não	não	não	não	não	não	sim	
40 horas	não	não	não	não	não	sim	sim	
120 horas	não	não	não	não	não	sim	sim	
Contagem (UFC)	0	0	0	130	30	32	>300	
<i>Staphylococcus aureus</i>	79,60	39,80	19,90	9,95	4,98	2,49	1,24	(mg/mL)
20horas	não	não	não	não	não	não	não	
40 horas	não	não	não	não	não	não	não	
120 horas	não	não	não	não	não	não	sim	
Contagem (UFC)	1	3	0	0	0	0	>300	
<i>Ps. aeruginosas</i>	79,60	39,80	19,90	9,95	4,98	2,49	1,24	(mg/mL)
20horas	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	
40horas	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	
120 horas	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	
Contagem (UFC)	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	
<i>Escherichia coli</i>	79,60	39,80	19,90	9,95	4,98	2,49	1,24	(mg/mL)
20horas	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	
40 horas	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	
120 horas	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	
Contagem (UFC)	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	
<i>Candida albicans</i>	79,60	39,80	19,90	9,95	4,98	2,49	1,24	(mg/mL)
40horas	não	não	não	não	não	não	sim	
80horas	não	não	não	não	não	não	sim	
120 horas	não	não	não	não	não	não	sim	
Contagem (UFC)	1	0	2	2	5	150	>300	

Legenda: "Sim e não" significa se houve ou não crescimento microbiano.

6 CONCLUSÕES

Avaliando-se a atividade dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L, *Cymbopogum winterianus* Jowitt, extraídos por arraste a vapor e por CO₂ supercrítico e *Cymbopogum citratus* DC. Stapf por arraste a vapor pode-se concluir:

1. O método de extração teve influência direta na composição química dos óleos essenciais. No caso do alecrim a composição variou de tal monta que alterou relação dos compostos majoritários. Seria importante avaliar a influência do método de extração no conceito de “quimiotipo”, usado para designar óleos essenciais de uma mesma espécie vegetal que, por questões edafoclimáticas, apresentam diferentes compostos majoritários.
2. A atividade antimicrobiana variou em função da composição química, porém esta variação se deve aos componentes que agem sinergicamente aumentando ou gerando a atividade antimicrobiana. Há, ainda, componentes que agem antagonicamente neutralizando ou reduzindo a atividade.
3. Compostos isolados nas frações, como o citronelol ou em maior proporção na fração, como o citral, foram efetivos na sua ação antimicrobiana. Portanto, o método de extração, com condições adequadas, pode favorecer a extração dos compostos de interesse, principalmente a extração por supercrítico.
4. O óleo essencial de capim limão, extraído por arraste a vapor, pode ser usado como substância desodorizante, desinfetante para uso geral, e desinfetante para lactários em concentrações superiores a 5,03 mg/mL. Os testes indicaram ação bactericida para estas classificações. Este tem ação bacteriostática como desinfetante para indústria de alimentos e para piscina, já que inibiu o crescimento da *Escherichia coli*.
5. Avaliando-se a fração F1 do óleo essencial de capim limão que tem o-cimeno e três vezes menos citral (neral + geranial) que fração F2 que não apresenta o-cimeno, frente aos microorganismos, verificou-se que o composto o-cimeno

tem forte atividade antimicrobiana e que o citral é outro potente composto antimicrobiano.

6. O óleo de capim limão teve ação bactericida frente aos microorganismos: *Enterococcus faecalis*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.
7. Os testes bioautográficos indicaram que o óleo essencial de citronela extraído por arraste a vapor pode ser usado como substância desodorizante, desinfetante para uso geral e desinfetante para lactários. Porém, nos teste de plaqueamento este apresentou apenas ação bacteriostática para *Salmonella choleraesuis*, indicando não se enquadrar na classificação proposta pela ANVISA.
8. O óleo essencial de alecrim extraído por arraste a vapor teve ação frente a *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Porém, suas frações não apresentaram ação, indicando que o sinergismo de seus compostos é que gera a ação antimicrobiana.
9. A fração F2 do óleo de citronela foi ativo contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus* e é composta apenas por citronelol. A fração F1 atuou frente *Pseudomonas aeruginosas* e *Bacillus subtilis*. As duas frações individualmente atuaram frente a nove microorganismos. O óleo essencial puro atuou frente a quatro microorganismos. Isso indica que no conjunto dos componentes do óleo existe um antagonismo que inibe a atividade antimicrobiana.
10. O óleo de citronela teve ação bactericida frente aos microorganismos: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* e teve ação bacteriostática frente à *Salmonella choleraesuis*.
11. Nenhum dos óleos ou frações testados teve ação frente a *Salmonella typhymurium*.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Investigar a variação do “quimiotipo” em função do método de extração, principalmente através do processo de extração por fluido supercrítico, o qual permite variar as condições de temperatura e pressão, a fim de se encontrar a seletividade para extrair compostos de interesse.

Fracionar os óleos essenciais, por destilação fracionada ou outro método que permita transformar uma substância complexa, como os óleos essenciais, em frações com menor número de compostos. Isso facilitará o estudo da atividade antimicrobiana ou mesmo de outros tipos de ação, de modo a identificar o composto ou compostos responsáveis pelo efeito estudado. Como por exemplo, testar a ação do citronelol como agente bactericida ou bacteriostático e identificar a CIM.

Observar o efeito da atividade antimicrobiana quando são acrescentados, a uma das frações, um composto ou uma outra fração. Como por exemplo, acrescentar o-cimeno e cariofileno em frações puras de citronelol ou de citral para verificar se há aumento da atividade ou inibição.

Avaliar a toxicologia dos compostos, para que estes possam ser aplicados em produtos e tragam benefícios seguros à população, inclusive a avaliação quantitativa dos riscos (QRA), conforme a aplicação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**. 4th ed. City: Allured Publishing Corporation, 804 pág, 2007

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA – ANVISA, **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**, Módulo IV.

ANTUNES, Gilberto Silveira. **Manual de diagnóstico bacteriológico**. Porto Alegre, Ed. da Universidade/UFRGS, 1995

ARAÚJO, Maria Eduarda Machado de. **Química Analítica aplicada aos produtos naturais**. Departamento de química e bioquímica. Faculdade de Ciências de Lisboa. Lisboa, 2005, 60p.

BERTUCCI, Ana *et alli*. Prospeccion química Del bosque de galeria Del rio Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(1) p. 21-25, jan/mar, 2008.

BERTUCCI, Ana. Curso de Extensão de Bioautografia, Pro - reitoria de Extensão e Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, janeiro de 2009.

BARRY, Arthur L. and THORNSBERRY, Clyde. In: **Manual of Clinical Microbiology** Lennette, E. H. Susceptibility Tests: Diffusion Test Procedures. Chapter 102. p.978-987, 1985.

BIDILACK, Wayne R. *et alli*. **Phytochemicals as Bioactive Agents**. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc, 2000. 274p.

CASSEL, E. ; VARGAS, Rubem Mário Figueiró . Proceso industrial de destilación por arrastre a vapor de aceite esencial de romero. **Revista de investigacion**, v. 01, p. 11-18, 2008.

CASSEL, E ; VARGAS, R ; MARTINEZ, N ; LORENZO, D ; DELLACASSA, E . Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 171-176, 2009.

CASSEL, E. ; VARGAS, Rubem Mário Figueiró ; BRUN, Gerti Weber . Supercritical Extraction of Essential Oil from *Ilex paraguariensis* Leaves. **Natural Product Communications**, v. 3, p. 373-378, 2008.

CASSEL, E. ; ROCHA, L. M. (Org.); **Fundamentos de tecnologia de productos fitoterapéuticos**, 2 ed. Porto Alegre, Edipucrs, 2008. CD-ROM

COOPER, Donald R. e SCHINDLER, Pámela. **Método de pesquisa em administração**. Porto Alegre: Bookman, 2003. 643p.

CURIONI, Ana e ARIZIO, Osvaldo. **Plantas aromáticas y medicinales: labiadas**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 2006. 194p.

DUARTE, Maria Cristina Teixeira. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, V. 7, outubro, 2006.

ESMERINO, Luis Antonio, *et alli*. Método Microbiológico para determinação para a potência de antimicrobianos. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, 10(1): p. 53-60, mar, 2004

Farmacopéia Brasileira. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FURLÁN, R.L.E. ; LÓPEZ S. N. (2006) Métodos Bioautograficos, em Zacchino S.; Gupta, M. **Manual de técnicas in vitro para La deteccion de compuestos antifúngicos**, CYTED, p.57-73, 2006

FRANCO, Joceline. **Prospecção fitoquímica e análise e microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea F.v. Muell. Ex.Benth., myrtaceae***. Curitiba, 2005. Dissertação de mestrado. Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Brasil.

FRATERNALE, Daniele, *et alli*. Chemical Composition, Antifungal and In Vitro Antioxidante Properties of *Monarda didyma* L. Essential Oil. **Journal of Essencial Oil Research**. 18, p.581-585, Sep/Oct, 2006.

GIL, Antonio Carlos. **Como Elaborar projeto de pesquisa**. São Paulo: Atlas, 1993. 159p.

HOSTETTMANN, Kurt, QUEIROZ, Emerson F e VIEIRA, Paulo C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: Edufscar, 2003. 152p.

KUIATE, Jules-Roger, *et alli*. Chemical Composition and *in vitro* Antifungal properties of essential Oils from Leaves and Flowers of *Erigeron floribundus* (H.B. et K.) Sch. Bip. from Cameroon. **Journal of Essencial Oil Research**. 17, p 261-264. May/Jun, 2005.

KÜRKÇÜOĞLU, M. *et alli*. Compositiion and Antimicrobial Activity of *Calamintha betulifolia* Boiss *et* Bal. **Journal of Essencial Oil Research**. 19, p 285-287. May/Jun, 2007.

LIMA, Helena R. P. ; KAPLAN, M.A.C. ;CRUZ, A. V. M. ,Influência dos fatores Abióticos e variabilidade dos terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**. V. 10, n° 2, p. 71-77. Ago/Dez, 2003

LIMA, Igara de Oliveira, *et alli*. Atividade fúngica de óleos essenciais sobre espécies de cândida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16(2). Abr/Jun, 2006.

LOURENÇO, Felipe Rebello. **Doseamento microbiológico de gentamicina por difusão de Agar** – proposta de delineamento experimental. São Paulo, 2006. 200p. Dissertação de mestrado em Farmácia. Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, Brasil.

MELO, Rosana C. de A. Plantas Medicinais, óleos essenciais e aromas. **Revista Eletrônica Nutritime**, V.2. n.2 p.193-200, Março/Abril, 2005. Disponível em <http://www.nutritime.com.br>.

MIRALDI, E. y col. (2001). **Quality control of aromatic drugs reported in European Pharmacopoeia**, 3rd edition. II Farmaco56: 365-371

NASCIMENTO, Paula F.C. *et alli*. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial de métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 17(1) 108-113. Jan/Mar. 2007.

NCCLS- *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição, M2-A8, EUA, 2003, Volume 23 nº1. (atual CLSI - www.clsi.org)

OLADIMEJI, F.A.; ORAFIDIYA, Lara O.; OKEKE, I.N. Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke. **The International Journal of Aromatherapy**. 14, p. 162-168, 2004.

ROSSI, Paul-Georges, *et alli*. Antibacterial Action of Essential Oils from Corsica.. **Journal of Essencial Oil Research**. 19,2, p. 176-182. Mar/Apr, 2007.

SABULAL, Baby. *et alli*. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Rhizome and Leaf Oils o f *Amomum Hypoleucum Thwaites*. **Journal of Essencial Oil Research**. 19,3, p 279-281. May/Jun, 2007.

SAMUELSSON, Gunnar. **Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy**. Stockholm, Swedish Pharmaceutical Press, 1999. 551p.

SANTOYO, S. *et alli*. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil obtained via Supercritical Fluid Extration. **Journal of Food Protection**, V.68. n.4. p.790-795, 2005.

SIMÕES, Claudia Maria Oliveira *et alli*. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1^a Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed.UFSC,1999. 821p.

SVOBODA, Katerina Pavla. SVOBODA, Tomas Galen e SYREDE Andrew. **Secretary Structures of Aromatic and Medicial Plants**. Knighton: Microscopux Publications, 2000. 60p.

TAN, Manliang *et alli*. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of th Flower Oil of *Russowia sogdiana (Bunge) B. Fedtsch. (Asteraceae)* from China. **Journal of Essencial Oil Research**. 19, p.197-200, Mar/Apr, 2007

The United States Pharmacopeia, The national formulary. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990.

TZAKOU, O., *et alli*. Composition and Antimicrobial Activity of *Chenopodium botrys*L. Essential Oil from Greece. **Journal of Essencial Oil Research**. 19, p 292-294. May/Jun, 2007.

VALGAS, Cleidson. **Avaliação de método de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais**. Florianópolis. 2002. 103p. Dissertação de mestrado em Farmácia. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina.

VARGAS, Rubem Mário Figueiró *et alli*; . The Carqueja Essential Oil Supercritical Extraction: Experiments and Modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Brazil, v. 23, n. 03, p. 375-382, 2006.

WAGNER, Hildebert; BLADT, Sabine. **Plant drugs analysis a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 384p.